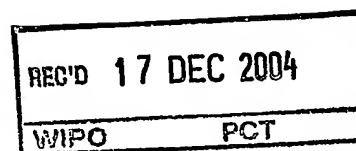


ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

 **ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37

Наш № 20/12-699



“4” ноября 2004 г.

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности (далее – Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) заявки № 2003135605 на выдачу патента на изобретение, поданной в Институт в декабре месяце 10 дня 2003 года (10.12.2003).

Название изобретения:

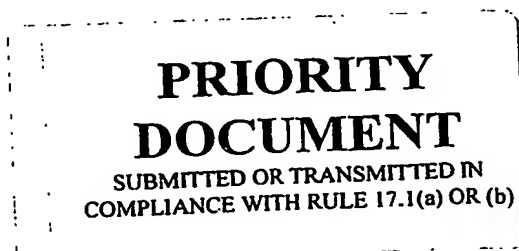
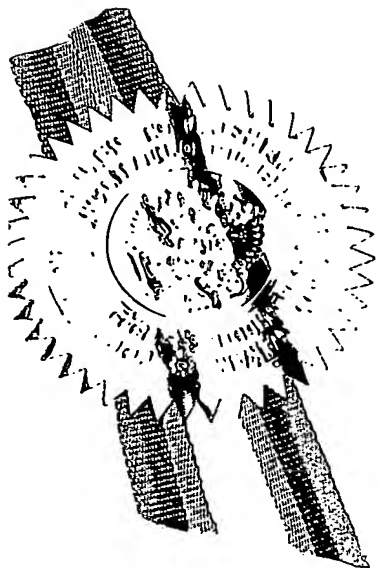
Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы
при сахарном диабете, фармакологическое средство
на его основе и способ его применения

Заявитель:

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГА-
НИЗАЦИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ
БИОРЕГУЛЯЦИИ И ГЕРОНТОЛОГИИ СЗО РАМН»

Действительные авторы:

ХАВИНСОН Владимир Хацкелевич
МАЛИНИН Владимир Викторович
ГРИГОРЬЕВ Евгений Иосифович
РЫЖАК Галина Анатольевна



Заведующий отделом 20

А.Л. Журавлев

BEST AVAILABLE COPY

2003135605

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете, фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для лечения сахарного диабета как средство, регулирующее уровень глюкозы.

Наиболее близкими аналогами такого же назначения, которыми осуществляется медикаментозная терапия сахарного диабета типа 1, являются препараты инсулина. Препаратом выбора являются рекомбинантные или генно-инженерные препараты инсулина человека короткого действия: актрапид, хумулин Р, инсуман Р, биосулин Р, а также препараты инсулина человека продленного действия: протофан, хумулин Н, инсуман-базаль и биосулин Н. Аналоги инсулина человека - ультракороткого и пролонгированного действия. К препаратам инсулина ультракороткого действия относится хумалог и новорапид, которые отличаются более быстрым началом действия после их введения и укороченным периодом максимального действия по сравнению с инсулинами короткого действия и эффективны в отношении снижения постпрандиального уровня глюкозы. Однако инсулинотерапия является заместительной, при которой возможны осложнения: аллергические реакции, гипогликемические состояния, инсулинорезистентность и постинсулиновые липодистрофии. Медикаментозная терапия сахарного диабета типа 2 также претерпела изменения, в связи с внедрением в клиническую практику препаратов короткого действия: новонорм или репаглинид и старликс. Традиционно остаются сульфонилмочевинные препараты: группа глибенкламида, глипизида, группа гликлазида, гликвидона и амарил (глимепирид), который является препаратом пролонгированного действия и имеет ряд преимуществ перед другими сульфонилмочевинными препаратами. Диабетон МВ и глибенез-ретард являются препаратами продленного действия. Следует отметить, что часто у больных сахарным диабетом развивается так называемая вторичная резистентность к сульфонилмочевинным препаратам, связанная со снижением остаточной секреции инсулина. При применении препаратов сульфонилмочевины наблюдаются побочные эффекты: диспепсические расстройства, аллергические реакции, угнетение функции костного мозга, токсическое воздействие на печень и почки, возникновение гипогликемии. Применяются также бигуаниды - метформин (глюкофаж, сиофор и др), глитазоны или сенситайзеры инсулина: актос и авандия и ингибиторы альфа-глюкозидаз: акарбоза и меглитол. Эти пероральные препараты повышают чувствительность тканей к инсулину и оказывают нормализующее

влияние на некоторые показатели углеводного обмена. Вместе с тем их применение может быть ограничено из-за низкой эффективности или побочных эффектов (Балаболкин М.И. Диабетология. — М.: Медицина, 2000. — 672 с.; Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. 10 вып. — М.: РЛС-2003. — 2003. — 1438 с.)

Известен декапептидный фрагмент инсулина (Патент РФ №2078769 «Пептидный фрагмент, обладающий биологической активностью инсулина», МПК А61К38/28, 1997), обладающий биологической активностью сравнимой с активностью инсулина.

Известны аналоги пептида р277 - эпитопа человеческого белка теплового шока (hsp 60) (Патент РФ №2159250 «Аналоги пептида р277 и содержащие их фармацевтические композиции для лечения и диагностики диабета», МПК А61К39/00, 38/00, 2000).

Однако биологическая активность, указанная в перечисленных выше патентах, проявляется в инсулиноподобном действии этих пептидов и может использоваться с целью создания пептидных препаратов для лечения сахарного диабета типа 1.

Известны короткие инсулинпотенцирующие пептиды, описанные в патенте (EP № 1268518 «Insulin potentiating peptides», МПК C07K5/10; А61К38/07; А61К38/08, 2001), принятом за прототип по отношению к фармакологическому средству (фармацевтической композиции) и способу профилактики и/или лечения сахарного диабета. Известные короткие инсулинпотенцирующие пептиды представляют собой пептидные фармацевтические агенты, которые могут использоваться для лечения сахарного диабета.

Следует отметить, что заявляемое пептидное соединение - тетрапептид - структурных аналогов не имеет.

Заявляемое изобретение направлено на получение нового биологически активного соединения пептидной природы, регулирующего уровень глюкозы при сахарном диабете типа 1 и типа 2.

Настоящее изобретение относится к новому тетрапептиду лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид общей формулы $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ последовательности 1 [SEQ ID NO:1].

Тетрапептид получают классическим методом пептидного синтеза в растворе (Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. - М.: Мир, 1985. - 456 с.).

Настоящее изобретение относится к новому тетрапептиду лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид общей формулы: $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ последовательности 1 [SEQ ID

NO:1], обладающему биологической активностью, проявляющейся в регуляции уровня глюкозы.

Действие тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, направленное на регуляцию уровня глюкозы при сахарном диабете, выявлено при его изучении в эксперименте при аллоксановом диабете. Как известно, аллоксановый диабет характеризуется поражением β -клеток поджелудочной железы и сопровождается выраженной гипергликемией, вследствие дефицита инсулина и активации глюконеогенеза.

В результате экспериментального изучения установлено, что тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ не обладает токсичностью.

Настоящее изобретение также относится к фармакологическому средству (фармацевтической композиции), регулирующему уровень глюкозы при сахарном диабете, содержащему в качестве активного пептидного агента эффективное количество тетрапептида лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид общей формулы Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ последовательности 1[SEQ ID NO:1].

Понятие «фармакологическое средство», используемое в данной заявке, подразумевает использование такой лекарственной формы, содержащей эффективное количество тетрапептида общей формулы Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, которая может найти профилактическое и/или лечебное применение в медицине в качестве средства для регуляции уровня глюкозы при сахарном диабете.

Понятие «эффективное количество», используемое в данной заявке, подразумевает использование того количества активного пептидного агента, которое в соответствии с его количественными показателями активности и токсичности, а также на основании знаний специалиста должно быть эффективным в данной лекарственной форме.

Для получения фармацевтических композиций, отвечающих изобретению, предлагаемый тетрапептид смешиваются как активный ингредиент с фармацевтически приемлемым носителем согласно принятым в фармацевтике способам компаундирования.

Носитель может иметь различные формы, которые зависят от лекарственной формы препарата, желаемой для введения в организм, например, парентерального или перорального.

При изготовлении композиций в предпочтительной дозированной форме для перорального применения могут использоваться известные фармацевтические компоненты.

Для парентерального введения носитель обычно включает стерильную воду, хотя могут быть включены другие ингредиенты, способствующие стабильности, или для сохранения стерильности.

В соответствии с настоящим изобретением, пациентам, нуждающимся в профилактике и/или лечении, фармакологическое средство назначается предпочтительно для парентерального и/или перорального применения.

Настоящее изобретение также относится к способу профилактики и/или лечения сахарного диабета, и включает профилактическое и/или лечебное введение пациенту, фармакологического средства, содержащего в качестве активного пептидного агента эффективное количество тетрапептида общей формулы $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ в дозах 0,1 - 30 мкг/кг массы тела, по крайней мере, один раз в день в течение периода, необходимого для достижения терапевтического эффекта.

Согласно изобретению фармакологическое средство, содержащее тетрапептид $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ активно при введении его в дозах 0,1-30 мкг/кг массы тела, хотя могут быть использованы и более низкие (высокие) дозы в зависимости от характера течения патологического процесса.

Технический результат, достигаемый при использовании изобретения, заключается в регуляции уровня глюкозы у пациента, нуждающегося в этом, за счет увеличения секреции инсулина и повышения чувствительности тканей к инсулину.

Сущность изобретения поясняется таблицами.

В Таблице 1 показано влияние тетрапептида $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом (вариант лечения).

В Таблице 2 показано влияние тетрапептида $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом (вариант профилактики и лечения).

В Таблице 3 показано влияние тетрапептида $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ в разных дозах на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом.

В Таблице 4 показано влияние тетрапептида $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ на содержание инсулина в крови крыс с аллоксановым диабетом.

В Таблице 5 показано влияние сахарной нагрузки на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом (44 сутки после завершения курса тетрапептида $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$).

В Таблице 6 показано влияние инсулина на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом (28 суток после завершения курса тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂).

В Таблице 7 представлено распределение больных сахарным диабетом при проведении исследования.

В Таблице 8 показана эффективность парентерального введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ у больных сахарным диабетом типа 1 и типа 2, получавших инсулин.

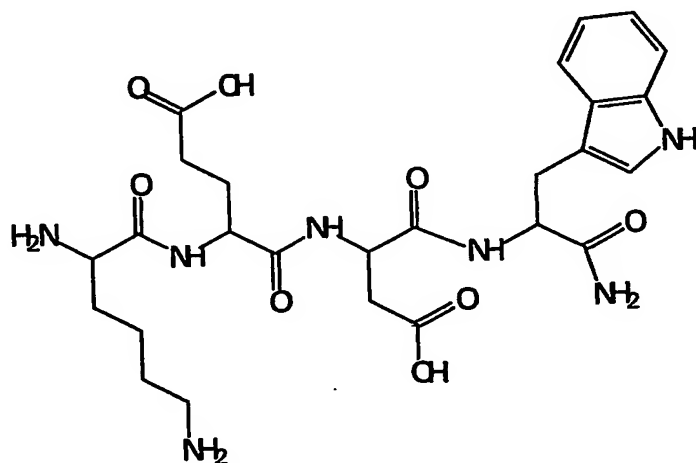
Настоящее изобретение иллюстрируется примером синтеза тетрапептида формулы лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид (Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂) (пример 1), примерами испытания биологической активности тетрапептида (примеры 2, 3, 4, 5, 6, 7), а также примером результатов клинического применения тетрапептида, демонстрирующим его фармакологические свойства и подтверждающим возможность достижения профилактического и/или лечебного эффекта (пример 8).

Пример 1. Синтез тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂

1. Название соединения: лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид

2. Структурная формула:

H-Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂



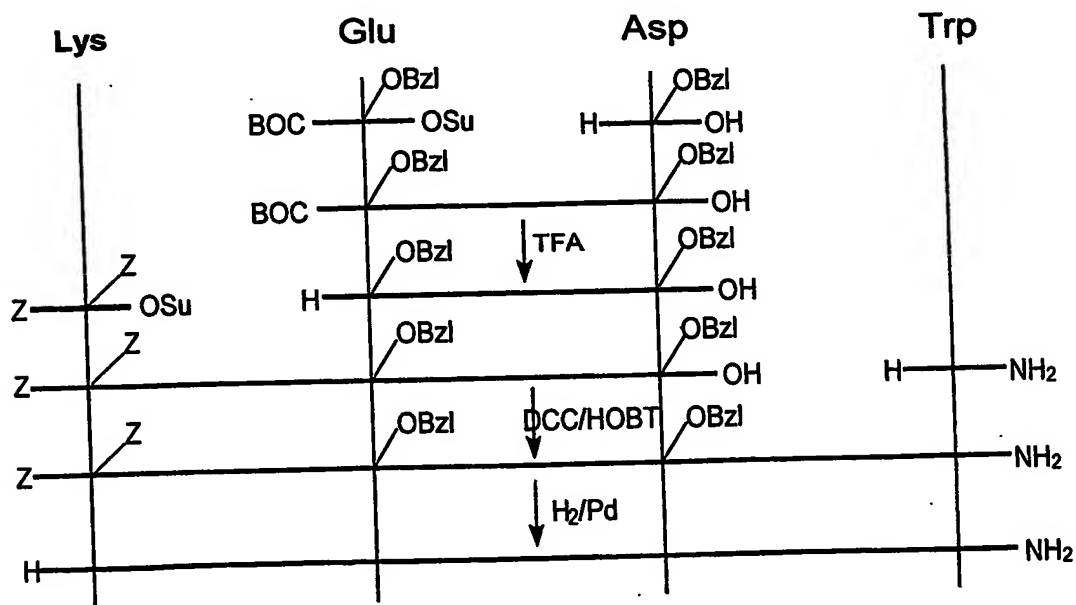
3. Брутто-формула: $C_{26}H_{37}N_7O_8$

4. Молекулярный вес: 575,62

5. Противоион: отсутствует

6. Внешний вид: белый аморфный порошок без запаха

7. Способ синтеза: пептид получен классическим методом синтеза в растворе по схеме:



Z - бензилоксикарбонильная группа

BOC - трет.бутилоксикарбонильная группа

OSu - N-оксисукцинимидный эфир

OBzl - бензиловый эфир

DCC - N,N'-дициклогексилкарбодиимид

HOBT - N-оксибензотриазол.

В качестве растворителя использовали N,N'-диметилформамид, при введении аспарагиновой кислоты использовали защиту α -COOH группы солеобразованием с триэтиламином. Деблокирование BOC-защитной группы проводили раствором трифторуксусной кислоты (TFA), Z-защитных групп каталитическим гидрогенолизом. Очистка препарата осуществлялась методом препаративной хроматографии на колонке с нормальной фазой (силикагель).

6. Характеристики готового препарата:

- аминокислотный анализ Lys Glu Asp Trp
 0,95 1,00 1,06 0,90
- содержание основного вещества: 97,48 % (по ВЭЖХ, 220 нм)
- ТСХ – индивидуален, $R_f=0,64$ (пластинки ПТСХ-П-В-УФ Sorbfil, силикагель СТХ-1ВЭ 8-12 мкм, ацетонитрил : вода 3:1)
- содержание влаги: 7 %
- рН 0,01 % раствора: 4,05
- УФ-спектр: пик при 280 нм - индольное кольцо триптофана
- удельное оптическое вращение : $[\alpha]_D^{23}$: - 26,53 ° (с=1,0 ; H₂O),
"Polamat A", Carl Zeiss Jena.

Пример синтеза:

1) BOC-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (I), N-трет.бутилоксикарбонил-(γ -бензил)глутамил-(β -бензил)аспартат.

N-оксисукцинимидный эфир N-трет.бутилоксикарбонил-(γ -бензил)глутаминовой кислоты BOC-Glu(OBzl)-OSu 4,34 г (0,0100 моль) растворяют в 20 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин 1,72 мл (0,0125 моль) и β -бензиласпартат 2,80 г (0,0125 моль). Перемешивают при комнатной температуре 24 час. Продукт высаживают 0,5н раствором серной кислоты (150 мл), экстрагируют в этилацетат (3x30 мл), промывают 0,5н раствором серной кислоты (2x20 мл), водой, 5% раствором бикарбоната натрия (1x20 мл), водой, 0,5н раствором серной кислоты (2x20 мл), водой и сушат над безводным сульфатом натрия. Этилацетат фильтруют, упаривают в вакууме при 40 °C, остаток сушат в вакууме над P₂O₅. Получают масло 5,68 г ($\approx 100\%$). $R_f = 0,42$

(бензол-ацетон 2:1, пластинки ПТСХ-П-В-УФ Sorbfil, силикагель СТХ-1ВЭ 8-12 мкм, проявление УФ и хлор/бензидин).

2) **TFA·H-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (II), трифторацетат (γ-бензил)-глутамил-(β-бензил)аспартата.**

N-трет.бутилоксикарбонил-(γ-бензил)глутамил-(β-бензил)аспартат (I) 5,68 г (≈ 0,01 моль) растворяют в 20 мл смеси дихлорметан-трифторуксусная кислота (3:1). Через 2 часа растворитель упаривают в вакууме при 40°C, упаривание повторяют с новой порцией дихлорметана (2x10 мл), остаток сушат в вакууме над NaOH. Получают масло 5,80 г (≈100%). $R_f = 0,63$ (н-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода, 15:10:3:12).

3) **Z-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (III), 838,92 N,N^ε-дибензилоксикарбониллизил-(γ-бензил)глутамил-(β-бензил)аспартат.**

Трифторацетат (γ-бензил)глутамил-(β-бензил)аспартата (II) 5,65 г (0,01 моль) растворяют в 10 мл диметилформамида, добавляют триэтиламин 2,80 мл (0,02 моль) и N-оксисукцинимидный эфир N,N^ε-дибензилоксикарбониллизина 6,64 г (0,013 моль). Смесь перемешивают 24 часа при комнатной температуре.

Продукт высаживают 0,5н раствором серной кислоты (150 мл), экстрагируют в этилацетат (3x30 мл), промывают 0,5н раствором серной кислоты (2x20 мл), водой, 5% раствором бикарбоната натрия (1x20 мл), водой, 0,5н раствором серной кислоты (2x20 мл), водой и сушат над безводным сульфатом натрия. Этилацетат фильтруют, упаривают в вакууме при 40°C, остаток закристаллизовывают в системе этилацетат/гексан. Продукт отфильтровывают и сушат в вакууме над P₂O₅. Выход 6,04 г (72 %). Т пл.=142 °C. $R_f = 0,60$ (бензол-ацетон, 1:1).

4) **Z-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Trp-NH₂ (IV), 1024,15 N,N^ε-дибензилоксикарбониллизил-(γ-бензил)глутамил-(β-бензил)аспартил-триптофан амид.**

$\text{HCl} \cdot \text{H-Trp-NH}_2$, гидрохлорид амида триптофана 1,8 г (7,2 ммоль) суспендируют в 15 мл тетрагидрофурана и при перемешивании добавляют триэтиламин 1,0 мл (7,2 ммоль), далее через 5 мин. N,N^{ϵ} -дibenзилоксикарбонил-лизил-(γ -бензил)глутамил-(β -бензил)аспартат (III) 4,0 г (4,8 ммоль), N-оксибензотриазол 0,8 г (5,8 ммоль) и охлаждают смесь до 0°C. Затем добавляют охлажденный до 0°C раствор $\text{N,N}'$ -дициклогексилкарбодиимида 1,2 г (5,8 ммоль) в 5 мл тетрагидрофурана, перемешивают смесь при этой температуре 2 часа и оставляют на ночь перемешиваться при комнатной температуре. Реакционную смесь выливают в ледяную воду (150 мл), выпавший осадок растирают и отфильтровывают. Осадок суспендируют в этилацетате (200 мл) и промывают образовавшийся гель последовательно 1 N H_2SO_4 (2x100мл), водой (2x100 мл), 5% NaHCO_3 (2x100 мл), 1 N H_2SO_4 (2x100мл), водой (2x100 мл), насыщенным раствором NaCl. Растворитель упаривают в вакууме, остаток закристаллизовывают и дважды перекристаллизовывают в изопропиловом спирте. Выход 4,9 г (95%), $R_f = 0,67$ (бензол-ацетон, 2:1).

5) **H-Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ (V), лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид, 575,62**

N,N^{ϵ} -дикарбобензоксизил-(γ -бензил)глутамил-(β -бензил)аспартил-триптофан амид (IV) 4,7 г гидрировали в системе метанол-вода (5:1) над катализатором Pd/C. Контроль за полнотой деблокирования в ТСХ системах бензол-ацетон (2:1) и ацетонитрил-вода (1:3). По окончании реакции катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме и остаток закристаллизовывали в системе вода/метанол. Продукт сушили в вакууме над КОН. Выход 2,6 г (95 %). $R_f = 0,64$ (ацетонитрил-вода, 1:1). Для очистки продукта 2,6 г вещества растворяли в 5 мл смеси ацетонитрил-вода (1:3) и наносили на колонку 21x4,5 см с силикагелем "Sigma", 230-400 меш (40-63 μ). Элюирование системой ацетонитрил-вода (1:3). Получено 1 г хроматографически однородного вещества.

6) **Анализ готового препарата.**

- Содержание основного вещества определяли методом ВЭЖХ на колонке Nucleosil C18 4,6x250 mm. А: 0,1% TFA; В: MeCN; grad. В 0→30% за 30 мин. Скорость потока 1 мл/мин. Детекция при 220 нм, сканирование 190-600 нм, проба 20 μ л. Содержание основного вещества 97,48%.

Аминокислотный анализ проводили на анализаторе ААА"Т-339" Prague.

Lys	Glu	Asp	Trp
0,95	1,00	1,06	0,90

- ТСХ: индивидуален, $R_f = 0,64$ (ацетонитрил-вода 3:1, пластинки ПТСХ-П-В-УФ Sorbfil, силикагель СТХ-1ВЭ 8-12 мкм, проявление хлор/бензидин и УФ).
- Содержание влаги: 7% (гравиметрически по потере массы при сушке 20 мг при 100 °C).
- pH 0,01% раствора: 4,05 (потенциометрически).
- Удельное оптическое вращение: $[\alpha]_D^{23}$: -26,53° ($c=1.0$ H₂O), "Polamat A", Carl Zeiss Jena.
- УФ-спектр: пик при 280 нм - индольное кольцо триптофана, "Beckman DU 650", 0,001 % раствор в воде.

Пример 2. Влияние тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ на течение аллоксанового диабета у крыс (вариант лечения)

Эксперимент проведен на 21 белых беспородных крысах-самцах со средней массой тела 375 ± 35 г. После определения концентрации глюкозы в крови все животные рандомизированно были разделены на 2 группы. Затем всем животным однократно внутривенно ввели по 1 мл раствора аллоксана («Spofa») в дозе 35 мг/кг. Через 15 сут животным контрольной группы начали вводить внутривенно ежедневно однократно по 0,3 мл 0,9% раствора NaCl, а крысам основной группы – тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ в дозе 3 мкг (в 0,3 мл 0,9% раствора NaCl) на крысу в течение 11 суток.

Результаты эксперимента приведены в таблице 1, из которой следует, что введение тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ способствовало достоверному снижению уровня глюкозы в крови у животных во все сроки исследования в среднем на 38,4% (30-47,7%). Снижение уровня глюкозы при введении тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ коррелировало со снижением летальности среди животных основной группы. Так, в контрольной группе животных к завершению эксперимента (84 сут от момента введения аллоксана) летальность составила 70%, в то время как в группе крыс, получавших тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, – только 36,4%. Таким образом, применение тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ позволило

уменьшить летальность у животных с аллоксановым диабетом почти в 2 раза.

Пример 3. Влияние тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* на течение аллоксанового диабета у крыс (вариант профилактики и лечения)

Эксперимент проведен на 15 белых беспородных крысах-самцах со средней массой тела 375 ± 35 г. Животные рандомизированно были разделены на 2 группы. Контрольным животным вводили внутривенно ежедневно однократно по 0,3 мл 0,9% раствора NaCl, а крысам основной группы – тетрапептид *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* в дозе 3 мкг (в 0,3 мл 0,9% раствора NaCl) на крысу в течение 7 суток. Затем всем животным однократно внутривенно вводили по 1 мл раствора аллоксана («Spofa») в дозе 35 мг/кг. Тетрапептид *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* продолжали вводить еще в течение 3 сут после введения аллоксана. Затем крысам основной группы провели 2-й курс тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* с 18 по 28 сут (всего 11 сут) в той же дозе.

Результаты эксперимента приведены в таблице 2. Прежде всего, необходимо отметить, что введение тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* здоровым животным не приводило к снижению концентрации глюкозы в крови. У животных контрольной группы во все сроки эксперимента после введения аллоксана отмечено развитие диабета с увеличением уровня глюкозы в крови в 1,9-4,9 раза по сравнению с исходным уровнем. У крыс, получивших 1 курс тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂*, отмечено снижение уровня глюкозы на 22-30% по сравнению с контролем. После проведения 2-го курса тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* у крыс отмечена полная нормализация концентрации глюкозы в крови во все исследованные сроки (28, 33, 40 сут), в то время как у контрольных животных в эти же сроки содержание глюкозы в крови было выше соответственно в 2; 4,2; 3,8 раза.

Следует также отметить, что тяжелая форма диабета развилась только у 2 из 8 крыс, получивших тетрапептид *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂*, в то время как в контрольной группе – у 5 из 7 крыс, т.е. этот показатель у контрольных животных был в 2,9 раза выше.

К завершению опыта (40 сут от момента введения аллоксана) в контроле сохранилось 57,1% животных, а при введении тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* – 75%.

Результаты эксперимента дают основание сделать вывод, что применение тетрапептида

Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ способствует полной нормализации уровня глюкозы в крови у крыс с аллоксановым диабетом, что сопровождается снижением летальности.

Пример 4. Влияние тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ в разных дозах на течение аллоксанового диабета у крыс

Эксперимент проведен на 23 белых беспородных крысах-самцах со средней массой тела 375±35 г. Всем животным однократно внутривенно ввели по 1 мл раствора аллоксана («Sprofa») в дозе 35 мг/кг. Затем животные рандомизированно были разделены на 3 группы. Контрольным животным вводили внутривенно ежедневно однократно по 0,3 мл 0,9% раствора NaCl, крысам 2 и 3 группы – тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ в дозах 1 мкг (в 0,1 мл 0,9% раствора NaCl) и 10 мкг (в 1,0 мл 0,9% раствора NaCl) на крысу в течение 7 суток.

Результаты эксперимента приведены в таблице 3. Введение тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ крысам в дозе 1 мкг способствовало достоверному снижению показателя уровня глюкозы в крови в 1 и 4 сут после завершения курса препарата соответственно на 17,3 и 12,3% по сравнению с контролем. Введение же тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ крысам в дозе 10 мкг привело к более существенному достоверному снижению концентрации глюкозы в 1, 4, 7, 17 сут соответственно на 30; 23,8; 26; 12,7%. Из этих данных следует, что увеличение дозы тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ приводит к более выраженному действию на содержание глюкозы в крови у животных.

Пример 5. Влияние тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ на содержание инсулина в крови крыс с аллоксановым диабетом

Эксперимент проведен на 18 белых беспородных крысах-самцах со средней массой тела 375±35 г. После определения концентрации глюкозы в крови все животные рандомизированно были разделены на 2 группы. Затем всем животным однократно внутривенно ввели по 1 мл раствора аллоксана («Sprofa») в дозе 35 мг/кг. Через 15 сут контрольным животным начали вводить внутривенно ежедневно однократно по 0,3 мл 0,9% раствора NaCl, а крысам основной группы – тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ в дозе

3 мкг (в 0,3 мл 0,9% раствора NaCl) на крысу в течение 11 суток.

Результаты эксперимента приведены в таблице 4, из которой следует, что у животных на 15 сут после введения аллоксана развился диабет. У крыс, получивших тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, содержание инсулина в крови после введения препарата в течение 8 сут было в 3,9 раза выше, чем у животных контрольной группы. Во все последующие сроки эксперимента отмечено сохранение некоторого количества инсулина в крови крыс (13-18% от исходного уровня), в то время как у контрольных животных инсулин в крови полностью отсутствовал. К завершению опыта (70 сут от момента введения аллоксана) в контроле сохранилось 62,5% животных, а при введении тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ – 70%.

Анализ результатов эксперимента убедительно показал, что введение тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ животным с аллоксановым диабетом способствует сохранению некоторого уровня инсулина в крови, что связано, возможно, с частичным восстановлением структуры и функции клеток, вырабатывающих инсулин.

Пример 6. Влияние тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ на показатели сахарной кривой у крыс с аллоксановым диабетом

Эксперимент проведен на 13 крысах-самцах, которые были ранее в опыте (вариант лечения – 44 сут после окончания введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂). Отдельную группу составили 7 здоровых крыс с аналогичной массой тела. Всем животным внутривенно ввели по 1 мл 2% раствора глюкозы и затем определяли ее концентрацию в крови.

Результаты эксперимента представлены в таблице 5, из которой следует, что у здоровых крыс после введения глюкозы ее концентрация в крови составила через 5, 30, 60, 120 мин соответственно 203,9; 156,3; 124,6; 114,5% по сравнению с исходным уровнем, принятым за 100%. У контрольных животных аналогичный показатель составил соответственно 129,8; 127,5; 123,5; 121,1%, что указывает на резкое подавление функции поджелудочной железы после поражения аллоксаном. Этот же показатель у крыс, получивших тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, составил 142,9; 97,3; 95,6; 77,9%. Результаты этого эксперимента указывают на способность тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ стимулировать функцию поджелудочной железы у крыс с аллоксановым диабетом.

Пример 7. Влияние инсулина на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом после применения тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂*

Эксперимент проведен на 13 крысах-самцах, которые были ранее в опыте (вариант лечения – 28 сут после окончания введения тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂*). Отдельную группу составили 8 здоровых крыс с аналогичной массой тела. Всем животным внутривенно вводили инсулин (0,3 МЕ) и затем определяли концентрацию глюкозы в крови.

Результаты эксперимента приведены в таблице 6. У здоровых животных отмечено физиологическое резкое снижение уровня глюкозы, в то время как в контроле (аллоксановый диабет) этот показатель был в 2,8 раза ниже. У животных с аллоксановым диабетом, получивших тетрапептид *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂*, отмечено после введения инсулина достоверное снижение уровня глюкозы почти в 2 раза по сравнению с контролем. Эти данные указывают на способность тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* в значительной степени сохранять чувствительность тканей к инсулину.

Выявленные в результате экспериментального исследования свойства тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* позволяют считать показанным его профилактическое и/или лечебное применение в качестве средства, регулирующего уровень глюкозы, для лечения сахарного диабета.

Приведенные ниже результаты клинического изучения заявляемого тетрапептида демонстрируют его фармакологические свойства и подтверждают возможность осуществления изобретения.

Пример 8. Эффективность применения тетрапептида *Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂* у больных сахарным диабетом

Исследование проведено у 36 больных в возрасте от 16 до 83 лет (7 мужчин, 29 женщин). У 23 больных выявлен диабет типа 1, у 13 – типа 2. Длительность заболевания колебалась от 1 года до 30 лет. 32 больных получали инсулин. Большинство больных с сахарным диабетом типа 1 поступали в стационар в стадии декомпенсации. Содержание глюкозы в крови натощак колебалось от 9,5 до 27 ммоль/л; уровень гликозилированного гемоглобина – от 7,8 до 12,7%. Всем больным была назначена строгая диета. Методом

стратификационной рандомизации все больные были разделены на 2 группы, равные по возрасту, полу, длительности и тяжести заболевания (табл. 7). Дополнительно к стандартному лечению 16 больным сахарным диабетом был назначен тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ в дозе 10 мкг (в 1 мл 0,9% раствора NaCl) внутримышечно ежедневно однократно в течение 10 суток. 4 больным сахарным диабетом типа 2 дополнительно к стандартному лечению был назначен тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ в дозе 100 мкг (1 таблетка) 2 раза в день перед едой ежедневно в течение 10 суток. Пациенты контрольной группы получали в качестве плацебо по 1 мл 0,9% раствора NaCl по аналогичной схеме.

Результаты изучения эффективности тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ приведены в таблице 8. У 8 больных (из 16 получавших инсулин) после завершения курса тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ ежедневная доза инсулина была снижена в среднем на 8 ЕД (от 2 до 26 ЕД), и при этом достигнута компенсация. У 6 больных доза инсулина осталась прежней, и при этом достигнута компенсация. И только у 2 больных для достижения компенсации доза инсулина была увеличена: у одного на 4 ЕД, у второго — на 14 ЕД. В то же время, в контрольной группе (из 16 получавших инсулин) только у 2 пациентов доза инсулина для достижения компенсации осталась прежней, а у 14 больных для достижения компенсации доза инсулина была увеличена на 4-8 ЕД.

У больных сахарным диабетом типа 1 (1 больной) и типа 2 (3 больных) основной группы, получавших тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ в таблетированной форме, отмечено ежедневное снижение дозы инсулина на 25 ЕД, а у больных, получавших пероральные антидиабетические препараты, удалось достичь полной компенсации с уменьшением дозы препаратов практически в 2 раза.

Таким образом, применение тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ у больных сахарным диабетом способствовало, надо полагать, повышению чувствительности тканей к инсулину и некоторому восстановлению функции поджелудочной железы. Необходимо отметить достаточно высокую эффективность тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, что проявлялось в снижении дозы инсулина у 50% обследуемых пациентов, в то время как в контрольной группе подобного эффекта ни у одного больного достичь не удалось.

В качестве примеров приводим 3 краткие выписки из историй болезни:

Выписка из истории болезни № 1.

Больная К., 69 лет, инвалид 2-ой группы. Больна сахарным диабетом в течение 17 лет.

С 1986 г. получала таблетированные антидиабетические препараты, с 1996 г. переведена на инсулин. При обследовании выявлены поздние диабетические осложнения.

Диагноз: Сахарный диабет типа 2, вторичная инсулинорезистентность, диабетическая ретинопатия, полинейропатия, диабетическая нефропатия, симптоматическая гипертензия.

При поступлении в стационар: содержание глюкозы в крови натощак – 10 ммоль/л, через 2 ч после еды – 14 ммоль/л. Клинический анализ крови – норма, в моче белок – до 0,66 г/л, на ЭКГ отмечена гипертрофия левого желудочка. Ежедневная доза инсулина – 82 ЕД.

Терапия: диета, витамины группы В, берлитион, парентеральная форма фармацевтической композиции, включающая тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, по 10 мкг в/м ежедневно в течение 10 суток.

При выписке на 18 сут - содержание глюкозы в крови натощак – 5,9 ммоль/л. Ежедневная доза инсулина – 56 ЕД (снижение на 26 ЕД по сравнению с исходным уровнем). У больной отмечено значительное улучшение показателей коагулограммы.

Выписка из истории болезни № 2.

Больной М., 40 лет, инвалид 2-ой группы. Болен сахарным диабетом в течение 13 лет и со времени начала заболевания постоянно получает инсулин.

Диагноз: Сахарный диабет типа 1 средней степени тяжести, диабетическая ретинопатия, полинейропатия, энцефалопатия.

При поступлении в стационар: содержание глюкозы в крови натощак – 17,8 ммоль/л. Клинический анализ крови и мочи - норма. Ежедневная доза инсулина – 40 ЕД.

Терапия: диета, витамины группы В, парентеральная форма фармацевтической композиции, включающая тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, по 10 мкг в/м ежедневно в течение 10 суток.

При выписке на 15 сут - содержание глюкозы в крови натощак – 3,4 ммоль/л. Ежедневная доза инсулина – 32 ЕД (снижение на 8 ЕД по сравнению с исходным уровнем).

Выписка из истории болезни № 3.

Больная Л., 83 года. Болеет сахарным диабетом в течение 25 лет, получала различные антидиабетические таблетированные препараты. Строго соблюдает диету, чувствует себя удовлетворительно.

Диагноз: Сахарный диабет типа 2, диабетическая ретинопатия.

При поступлении в стационар: содержание глюкозы в крови натощак — 11 ммоль/л. Клинический анализ крови и мочи - норма. Принимает ежедневно по 2 таблетки диабетона. В связи с развившейся резистентностью к таблетированным антидиабетическим препаратам рекомендовано введение инсулина. Однако больная отказалась от инсулина, после чего ей был назначена пероральная форма фармацевтической композиции, включающая тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂, по 100 мкг (1 таблетка) 2 раза в день до еды ежедневно в течение 10 суток на фоне применения 2 таблеток диабетона. На 2-й день содержание глюкозы в крови натощак — 6 ммоль/л. Далее доза диабетона была уменьшена в 2 раза.

После завершения указанного курса лечения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ уровень глюкозы в крови оставался практически в пределах нормы. Состояние больной удовлетворительное.

Формула изобретения

- 1/ Тетрапептид лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид общей формулы $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ [SEQ ID NO:1].
- 2/ Тетрапептид лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид общей формулы $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ [SEQ ID NO:1], обладающий биологической активностью, проявляющейся в регуляции уровня глюкозы.
3. Фармакологическое средство пептидной природы, регулирующее уровень глюкозы содержащее активный пептидный агент и фармацевтически приемлемый носитель, отличающееся тем, что в качестве активного пептидного агента содержит эффективное количество тетрапептида $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ [SEQ ID NO:1].
4. Средство по п.3, отличающееся тем, что оно предназначено для парентерального введения или перорального применения.
5. Способ профилактики и/или лечения сахарного диабета, заключающийся во введении пациенту фармакологического средства, содержащего в качестве активного пептидного агента эффективное количество тетрапептида $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ в дозах 0,1 - 30 мкг/кг массы тела, по крайней мере, один раз в день в течение периода, необходимого для достижения терапевтического эффекта.
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что фармакологическое средство вводят парентерально.
7. Способ по п.5, отличающийся тем, что фармакологическое средство применяют перорально.
8. Способ по п.6, отличающийся тем, что фармакологическое средство по п.п. 3-4 активно при введении его в дозах 0,1-30 мкг/кг массы тела.

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете,
фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Таблица 1

Концентрация глюкозы в крови (мг %)									
Группа животных	Исходный уровень	Через 15 сут после введения аллоксана	Через 8 сут от начала введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	После окончания введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (сут)					
				1	9	18	28	44	58
Контроль (NaCl)	84.0 ± 5.7	345.0 ± 15.4	360.0 ± 12.3	342.5 ± 17.3	351.4 ± 11.2	368.3 ± 8.1	375.7 ± 11.2	347.2 ± 12.8	332.1 ± 13.7
n	10	10	9	8	7	6	5	5	3
Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	81.1 ± 3.8	333.6 ± 12.4	254.5 ± 16.2*	222.5 ± 10.3*	183.9 ± 10.5*	236.7 ± 10.3*	221.5 ± 11.2*	210.8 ± 9.3*	198.9 ± 11.5*
n	11	11	11	10	9	9	8	8	7

* - P<0.001 по сравнению с контролем.

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете, фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Таблица 2

Группа животных	Концентрация глюкозы в крови (мг %)						
	Исходный уровень	7 сут от начала введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (1 курс)	После введения аллоксана (сут)				
			5	14	21	28	
Контроль (NaCl)	82.7 ± 0.9	96.4 ± 1.0	351.7 ± 19.4*	333.7 ± 55.8*	345.6 ± 57.8*	156.4 ± 26.4*	405.0 ± 89.8*
n	7	7	7	6	5	5	4
Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	76.8 ± 1.1	94.0 ± 0.8	247.3 ± 17.2*#	261.5 ± 39.5*#	159.0 ± 32.6*#	77.3 ± 1.3#	107.7 ± 6.4#
h	8	8	8	8	6	6	6

* - $P < 0.001$ по сравнению с исходным уровнем;

- $P < 0.02$ по сравнению с контролем.

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете, фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Таблица 3

Группа животных	Концентрация глюкозы в крови (мг %)							
	Исходный уровень	После введения аллоксана (сут)		После введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (сут)				
		7	14	1	4	7	14	21
Контроль (NaCl)	78.6 ± 4.2	276.4 ± 0.9	272.1 ± 9.8	275.7 ± 9.7	278.6 ± 9.8	277.9 ± 11.1	275.0 ± 10.5	285.0 ± 12.9
n	7	7	7	7	7	7	6	6
Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (1 мкг)	80.6 ± 2.8	245.6 ± 12.3	261.7 ± 12.3	228.3 ± 10.7*	244.4 ± 12.2*	269.4 ± 8.6	268.8 ± 12.4	272.5 ± 9.9
n	9	9	9	9	8	8	8	8
Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (10 мкг)	83.9 ± 3.4	247.2 ± 14.0	252.2 ± 7.9	193.3 ± 6.7*	212.2 ± 7.3*	205.6 ± 8.4*	240.0 ± 7.9*	248.3 ± 13.5
n	7	7	7	7	7	7	6	6

* - P < 0.05 по сравнению с контролем.

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете, фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Таблица 4

Группа животных	Содержание инсулина в крови (Мк МЕ/мл)						
	Исходный уровень	Через 15 сут после введения аллоксана	Через 8 сут от начала введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	После окончания введения тетрапептида Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (сут)			
				1	9	18	28
Контроль (NaCl)	24.3 ± 2.1	2.0 ± 0.7	0.8 ± 0.25	0	0	0	0
n	8	8	8	7	6	5	5
Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	23.8 ± 2.8	1.5 ± 0.4	3.1 ± 1.1*	3.6 ± 0.7 [#]	3.2 ± 0.5 [#]	4.3 ± 0.5 [#]	4.1 ± 0.6 [#]
n	10	10	10	8	7	7	7
							3.9 ± 1.1 [#]

* - P<0.05 по сравнению с контролем;

[#] - P<0.001 по сравнению с контролем.

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете,
фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Таблица 5

Группа животных	Исходный уровень	Время после введения глюкозы (мин)			
		5	30	60	120
Здоровые	84.5 ± 4.2	172.3 ± 8.1	132.1 ± 9.1	105.3 ± 6.2	96.8 ± 5.3
n	7	7	7	7	7
Контроль (NaCl)	347.2 ± 12.8*	450.5 ± 15.2*	442.7 ± 14.3*	428.9 ± 14.1*	420.5 ± 16.5*
n	5	5	5	5	5
Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	210.8 ± 9.3 [#]	301.2 ± 10.5 [#]	205.1 ± 11.8 [#]	201.5 ± 13.2 [#]	164.2 ± 12.8 [#]
n	8	8	8	8	8

* - P<0.001 по сравнению со здоровыми;

[#] - P<0.05 по сравнению с контролем.

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете,
фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Таблица 6

Группа животных	Концентрация глюкозы в крови (мг %)		Снижение уровня глюкозы относительно исходного уровня (%)
	Исходный уровень	Через 30 мин после введения инсулина	
Здоровые	83.5 ± 3.2	29.4 ± 2.2	64.8
	n	8	
Контроль (NaCl)	$375.7 \pm 11.2^*$	$287.8 \pm 12.5^*$	23.4
	n	5	
Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	$221.5 \pm 11.2^{\#}$	$123.6 \pm 8.3^{\#}$	44.2
	n	8	

* - $P < 0.001$ по сравнению со здоровыми;

- $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете, фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Таблица 7

Показатель	Группа больных	
	Контрольная (плацебо)	Основная (тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂)
Количество больных	16	20
Мужчины	3	4
Женщины	13	16
Количество больных сахарным диабетом типа 1	11	12
Количество больных сахарным диабетом типа 2	5	8

Таблица 8

Показатель	Группа больных	
	Контрольная (плацебо)	Основная (тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂)
Количество больных	16	16
Снижение дозы инсулина для достижения компенсации	0	8
Сохранение дозы инсулина для достижения компенсации	2	6
Увеличение дозы инсулина для достижения компенсации	14	2

listPancragen.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Khavinson, Vladimir
Malinin, Vladimir
Grigoriev, Evgeny
Ryzhak, Galina

<120> Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете,
фармакологическое средство на его основе и способ его применения.

<130> IBG/09/2003

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Тетрапептид Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ регулирует уровень глюкозы при са-
харном диабете за счет увеличения секреции инсулина и повышения ч-
увствительности к нему тканей.

<400> 1

Lys Glu Asp Trp

1

Тетрапептид, регулирующий уровень глюкозы при сахарном диабете, фармакологическое средство на его основе и способ его применения

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано как средство, регулирующее уровень глюкозы для профилактики и лечения сахарного диабета.

Предлагается новый тетрапептид лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид общей формулы $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$, обладающей биологической активностью, проявляющейся в регуляции уровня глюкозы и фармакологическое средство, содержащее в качестве активного пептидного агента эффективное количество тетрапептида лизил-глутамил-аспартил-триптофан амид общей формулы $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$.

Предлагается способ профилактики и/или лечения сахарного диабета, включающий введение пациенту фармакологического средства, содержащего в качестве активного пептидного агента эффективное количество тетрапептида общей формулы $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ в дозах 0,1 - 30 мкг/кг массы тела, по крайней мере, один раз в день в течение периода, необходимого для достижения терапевтического эффекта.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.